



GP #1643  
1/17

PATENT  
ATTORNEY DOCKET NO. 11059/002001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Matsui et al.  
Serial No.: 09/369,735  
Filed : 08/06/99  
Title : THERMOPHILIC ENZYMES HAVING  $\beta$ -GLYCOSIDASE ACTIVITY

Art Unit: 1643  
Examiner: Unknown

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT(S) UNDER 35 U.S.C. 119

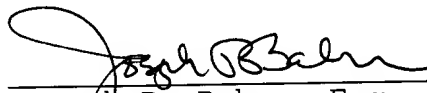
Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 U.S.C. 119 from Japanese Application No. 222866/1999 filed August 6, 1998. A certified copy of the application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please charge any fees due in this respect to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date:

9/13/99

  
Joseph R. Baker, Esq.  
Reg. No. 40,900

Fish & Richardson P.C.  
4225 Executive Square, Suite 1400  
La Jolla, CA 92037  
858  
Telephone: 619/678-5070  
Facsimile: 619/678-5099

101461LJ1

RECEIVED

SEP 20 1999

TECH CENTER 1600/2900

Date of Deposit

9/13/99

I hereby certify under 37 CFR 1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated above and is addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.



BRIGITTE CARIC



( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: August 6, 1998

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 222866/1998

Applicant(s): Director-General of Agency of  
Industrial Science and Technology

August 4, 1999

Commissioner,  
Patent Office

Takeshi Isayama (seal)

Certificate No. 11-3054806

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 1998年 8月 6日

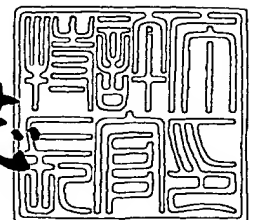
出 願 番 号  
Application Number: 平成10年特許願第222866号

出 願 人  
Applicant(s): 工業技術院長

1999年 8月 4日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3054806

【書類名】 特許願

【整理番号】 11900220

【提出日】 平成10年 8月 6日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N

【発明の名称】  $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素

【請求項の数】 7

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学  
工業技術研究所内

    【氏名】 松井 郁夫

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学  
工業技術研究所内

    【氏名】 石川 一彦

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学  
工業技術研究所内

    【氏名】 石田 紘靖

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学  
工業技術研究所内

    【氏名】 小杉 佳次

【特許出願人】

    【識別番号】 000001144

    【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【指定代理人】

    【識別番号】 220000404

    【氏名又は名称】 工業技術院 生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長の指定代理人

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】  $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよいアミノ酸配列からなり、かつ  $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素。

【請求項 2】 至適温度が 100℃ 以上である請求項 1 記載の酵素。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載の酵素をコードする DNA。

【請求項 4】 配列番号 1 の塩基配列を有する請求項 3 記載の DNA。

【請求項 5】 請求項 3 記載の DNA を含む組換えベクター。

【請求項 6】 請求項 5 記載の組換えベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 7】 請求項 1 または 2 に記載の酵素を製造する方法であって、該酵素をコードする DNA を含む発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、次いで培養物から該酵素を採取する工程を含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素に関し、より詳細には、パイロコッカス属に属する超好熱性細菌由来の  $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素に関する。

【0002】

【従来の技術】

$\beta$ -グリコシダーゼは糖質の加水分解、シークエンシング、糖タンパク質、糖脂質の構造解析、光学純度の高いオリゴ糖、複合糖質の合成に有用な酵素である。その反応は基質を構成する単糖の種類、グリコシド結合の光学異性、結合位置に特異的である。 $\beta$ -グリコシダーゼは糖鎖の修飾や立体光学異性を保持したオリゴ糖や多糖の合成に有用であると共に、グリコシド基を 1 級アルコール、2 級アルコール、3 級アルコールに転移するので、バイオサーファクタント等の複合

糖質の合成に有用である。今までに基質特異性の異なる種々の $\beta$ -グリコシダーゼが細菌や植物から発見されているが、多くが常温生物由来のため、耐熱性に乏しく、有機溶媒等も併用される苛酷な合成反応には不適當であった。

耐熱性であり、かつ有機溶媒中で活性な $\beta$ -グリコシダーゼが発見されれば、有機溶媒の存在下で優先される加水分解反応の逆反応つまり合成反応を用い、光学純度の高い複合糖質の合成反応に生体触媒を用いる新手法の開発が可能と考えられる。従って、極限環境下で活性な $\beta$ -グリコシダーゼが渴望されていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、 $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記の課題を解決すべく、 $90\sim 100^{\circ}\text{C}$ で生育する超好熱性細菌に着目し、その遺伝子配列から本酵素活性を示すタンパク質をコードすると推測される遺伝子を見い出した。さらに、その遺伝子は大腸菌に組み込んで、この形質転換された大腸菌を使ってその遺伝子から酵素を生産し、この酵素が高温（ $90^{\circ}\text{C}$ 以上）で安定に存在し、かつ $\beta$ -グリコシダーゼ活性を示すことを確認して、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよいアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素を提供する。本発明の酵素は、好ましくは、至適温度が $100^{\circ}\text{C}$ 以上である。

本発明は、また、上記の酵素をコードするDNAを提供する。一例として、このDNAは配列番号1の塩基配列を有する。

さらに、本発明は、上記のDNAを含む組換えベクター、この組換えベクターにより形質転換された宿主細胞、および上記の酵素を製造する方法であって、該酵素をコードするDNAを含む発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培

養し、次いで培養物から該酵素を採取する工程を含む前記方法を提供する。この方法により、本発明の酵素を多量に生産することができる。

【0006】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明を具体的に説明する。

本発明の酵素は、配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよいアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素である。配列番号2のアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素は、硫黄代謝高熱性古細菌パイロコッカス・ホリコシ（登録番号JCM9974）に由来する。その製造方法の一例を説明する。

【0007】

まず、パイロコッカス・ホリコシを培養した後、染色体DNAを調製する。次いで、染色体DNAを制限酵素により断片化し、ゲノムDNAライブラリーを作製し、パイロコッカス・ホリコシの染色体をカバーするクローンを選択して、クローンの整列化を行う。整列化されたクローンの塩基配列を決定し、 $\beta$ -グリコシダーゼをコードする遺伝子を同定する。 $\beta$ -グリコシダーゼをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号1に示す。この遺伝子をPCR反応で増幅し抽出した後、蛋白質発現プラスミド（例えば、pET11a或いはpET15b）に挿入、そのプラスミドを宿主細胞（例えば、大腸菌）に組み込み、本酵素の生産をおこなうことができる。生産された酵素は加熱処理およびカラムクロマトグラムで単離精製する。

【0008】

精製された当該酵素は、分子量約45,000のタンパク質で、 $\beta$ -グリコシドを加水分解する酵素であることがわかった。この酵素は250 mM NaClを含む50mMリン酸緩衝液（pH6.0）中で95℃で1時間処理しても、80%の活性が保持されていた。また、活性の至適pHは6.0で、至適温度はpH6.0で100℃以上であった。

上記酵素の変異体、すなわち、配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されているアミノ酸配列からなり、かつ $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素は、周知の技術、例えば部位特



異的突然変異誘発、PCR法などの手法を用いて調製することができる。

本発明の酵素は、糖質の加水分解、シーケンシング、糖タンパク質、糖脂質の構造解析、光学純度の高いオリゴ糖、複合糖質の合成などに利用することができる。

【0009】

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

#### （実施例1）（菌の培養）

JCM9974（理化学研究所微生物系統保存施設より入手）は次の方法で培養した。

13.5gの食塩、4gの $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、0.7gのKCl、0.2gの $\text{NaHCO}_3$ 、0.1gのKBr、30mgの $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、10gの $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.5gの $\text{CaCl}_2$ 、25mgの $\text{SrCl}_2$ 、1.0mlのレザスリン溶液（0.2g/L）、1.0gの酵母エキス、5gのバクトペプトンを1Lに溶かし、この溶液のpHを6.8に調整し加圧殺菌した。ついで、乾熱滅菌した元素硫黄を0.2%となるように加え、この培地をアルゴンで飽和して嫌気性とした後、JCM9974を植菌した。培地が嫌気性となったか否かは $\text{Na}_2\text{S}$ 溶液を加えて、培養液中で $\text{Na}_2\text{S}$ によるレザスリン溶液のピンク色が着色しないことにより確認した。この培養液を95℃で2～4日培養し、その後遠心分離し集菌した。

【0010】

#### （実施例2）染色体DNAの調製

JCM9974の染色体DNAは以下の方法により調製した。培養終了後5000rpm、10分間の遠心分離により菌体を集菌した。菌体を10mM Tris(pH 7.5) 1mM EDTA溶液で2回洗浄後InCert Agarose（FMC社製）ブロック中に封入した。このブロックを1%N-lauroylsarcosine、1mg/ml プロテアーゼK溶液中で処理することにより、染色体DNAをAgaroseブロック中に分離調製した。

【0011】

#### （実施例3）染色体DNAを含むライブラリークローンの作製

実施例2で得られた染色体DNAを制限酵素HindIIIにより部分分解後アガロース

ゲル電気泳動により約40kb長の断片を調製した。このDNA断片と制限酵素HindIIによって完全分解したBacベクターpBAC108L及びpFOS1とをT4リガーゼを用いて結合させた。前者のベクターを用いた場合には結合終了後のDNAをただちに大腸菌内へ電気孔窄法により導入した。後者のベクターpFOS1を用いた場合には結合終了後のDNAをGIGA Pack Gold（ストラタジーン社製）により試験管内でλファージ粒子内に詰め込み、この粒子を大腸菌に感染させることによりDNAを大腸菌内に導入した。これらの方法により得られた抗生物質クロラムフェニコール耐性の大腸菌集団をBAC及びFosmidライブラリーとした。ライブラリーからJCM 9974の染色体をカバーするのに適したクローンを選択して、クローンの整列化を行った。

## 【0012】

## （実施例4）各BAC或いはFosmidクローンの塩基配列決定

整列化されたBAC或いはFosmidクローンについて順次以下の方法で塩基配列を決定していった。大腸菌より回収した各BAC或いはFosmidクローンのDNAを超音波処理することにより断片化し、アガロースゲル電気泳動により1kb及び2kb長のDNA断片を回収した。この断片をプラスミドベクターpUC118のHincII制限酵素部位に挿入したショットガンクローンを各BAC或いはFosmidクローン当たり500クローン作製した。各ショットガンクローンの塩基配列をパーキンエルマー、ABI社製自動塩基配列読み取り装置373または377を用いて決定していった。各ショットガンクローンから得られた塩基配列を塩基配列自動連結ソフトSequencherを用いて連結編集し、各BAC或いはFosmidクローンの全塩基配列を決定していった。

## 【0013】

## （実施例5）β-グリコシダーゼ遺伝子の同定

上記で決定された各BAC或いはFosmidクローンの塩基配列の大型計算機による解析を行い、β-グリコシダーゼをコードする遺伝子（配列番号1）を同定した。

## 【0014】

## （実施例6）発現プラスミドの構築

構造遺伝子領域の前後に制限酵素（NdeIとBamHI）サイトを構築する目的でDNA

プライマーを合成し、PCRでその遺伝子の前後に制限酵素サイトを導入した。

Upper primer:

5'-TAAGAAGGAGATATACATATGCCGCTGAAATTCCCGGAAATGTTTCTCTTTGGTACC-3' (配列番号3)

Lower primer:

5'-TTTACTGCAGAGAGGATCCCTAATCCTAAAGTTGAAGTTCTGGTAG-3' (配列番号4)

PCR反応後、制限酵素(NdeIとBamHI)で完全分解(37℃で2時間)した後、その構造遺伝子を精製した。

pET11a或いはpET15b(Novagen社製)を制限酵素NdeIとBamHIで切断・精製した後、上記の構造遺伝子とT4リガーゼで16℃、2時間反応させ連結した。連結したDNAの一部をE. coli-XL1-BlueMRF<sub>1</sub>のコンピテントセルに導入し形質転換体のコロニーを得た。得られたコロニーから発現プラスミドをアルカリ法で精製した。

【0015】

(実施例7) 組換え遺伝子の発現

大腸菌(E. coli BL21(DE3), Novagen社製)のコンピテントセルを融解して、ファルコンチューブに0.1mL移す。その中に発現プラスミド溶液0.005mLを加え氷中に30分間放置した後42度でヒートショックを30秒間行い、SOCmedium 0.9mLを加え、37度で1時間振とう培養した。その後アンピシリンを含む2YT寒天プレートに適量まき、37度で一晩培養し、形質転換体を得た。なお、この形質転換体をE. coli BL21(DE3) pET15b/Gly2Mと命名して、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成10年7月14日に寄託した(受託番号:FERM P-16899)。

当形質転換体をアンピシリンを含む2YT培地(2リットル)で600nmの吸収が1に達するまで培養した後、IPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)を加えさらに6時間培養した。培養後遠心分離(6,000rpm, 20min)で集菌した。

【0016】

(実施例8) 耐熱性酵素の精製

集菌した菌体を-20℃で凍結後、室温で融解し、等量の50mMトリス塩酸緩衝

液 (pH 7.5) を加え懸濁液を得た。これに界面活性剤トライトンX-100を最終濃度2.5%になるように加え、得られた懸濁液に超音波を20分間照射した。そして85℃で30分間加熱した後、遠心分離(15,000 rpm、20分)し、上澄液を得た。これをHiTrap Q (ファルマシア社製) カラムに吸着させ、NaCl濃度勾配による溶出を行い活性画分を得た。さらに得られた活性画分溶液をNi-カラム (Novagen, His・Bind metal chelation resin & His・Bind buffer kitを使用) による親和性クロマトグラムを行った。ここで得られた60 mMイミダゾール流出画分をセントリプレップ30(アミコン社)で濃縮と250mM NaClを含む50mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 系へ置換し、精製酵素を得た。

【0017】

(実施例9) 酵素反応条件

(1) 加水分解反応

表1上段に示す5種の単糖のニトロフェニル誘導体と、酵素反応をpH5.0、85℃で行い、ニトロフェニル基の遊離による405 nm吸光度の上昇を測定した。そしてその相対活性をパラニトロフェニル-β-グルコサイド(Glcpβ Np)に対する活性を100%として表した。さらに、表1下段に示す12種の多糖、オリゴ糖、配糖体を用い、酵素反応をpH6.0、90℃で行い、遊離のグルコース量をグルコース定量用キット、グルコースCII-テストワコー (和光純薬製) を用いて測定し、配糖体であるサリシンに対する活性を100%として表した。

【0018】

(2) 至適温度と至適pH

Glcpβ Npを基質として測定した。至適温度は、50 mMのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)中で反応温度を50℃から100℃まで変化させ、ニトロフェニル基の遊離による405 nm吸光度を測定した。至適pHは上記測定条件における反応温度を90℃に固定し、酵素反応液のpHを酢酸緩衝液とリン酸緩衝液を用い3.9から8.0まで変化させ、405 nm吸光度の変化量より決定した。

【0019】

(3) 熱安定性と有機溶媒中での反応性

熱安定性は加熱後の残存活性測定により解析した。酵素(0.1 mg/ml)は250 mM

NaClを含む50 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)中で、95 °Cで1時間加熱され、急冷後残存活性が90°Cで至適温度測定と同じ条件で測定された。

有機溶媒中での反応性はGlc $\beta$ Npを基質としてエタノール或いはメタノールを10-40%含むリン酸緩衝液(pH 6.0)中で、60 °Cで所定時間反応させ、Glc $\beta$ Npの減少量をTSKgel G-Oligo-PWカラムを用いた高速液体クロマトグラムで分析し、有機溶媒を含まない上記反応条件での活性を100%として相対活性で表した。

## 【0020】

### 酵素の諸性質

#### (1) タンパク質化学的性質

当該酵素は423アミノ酸残基より構成され、その分子量は45,000 Daである。

#### (2) 基質特異性

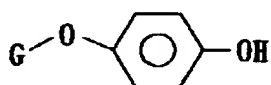
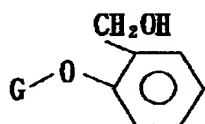
当該酵素は単糖のニトロフェニル誘導体に対して広い基質特異性を示し、特にGlc $\beta$ NpとGal $\beta$ Npを良い基質とした(表1上段)。また、表1下段に示すように、グルコ2糖類ではセロビオースよりラミナリビオースを良く分解することから当該酵素が $\beta$ -1,4-グルコシド結合より $\beta$ -1,3-グルコシド結合に高い活性を示すことが明らかになった。さらに、配糖体ではサリシンと $\beta$ -オクチルグルコサイドを良く分解することから還元性末端に芳香族環や長鎖アルキル基を含む $\beta$ -グルコシドを良い基質とすることが明らかになった。

【0021】

【表1】

(表1) 85℃, pH 5.0における加水分解反応の  
種々の基質に対する相対活性

基質	相対活性 (%)
Glc $\beta$ Np <sup>*1</sup>	100
Gal $\beta$ Np <sup>*2</sup>	97
Gal $\alpha$ Np <sup>*3</sup>	19
Man $\beta$ Np <sup>*4</sup>	7
Xyl $\beta$ Np <sup>*5</sup>	10
セロビオース	2
ラミナリン	0
ラミナリビオース	39
$\beta$ -メチル-D-グルコサイド	8
$\beta$ -オクチル-D-グルコサイド	40
サリシン	100
アルブチン	16
ラクトース	0
スクロース	0
マルトース	ND
CM-セルロース	0
アビセル	0



- \*1: パラニトロフェニル- $\beta$ -グルコサイド  
 \*2: パラニトロフェニル- $\beta$ -ガラクトサイド  
 \*3: オルトニトロフェニル- $\beta$ -ガラクトサイド  
 \*4: パラニトロフェニル- $\beta$ -マンノサイド  
 \*5: パラニトロフェニル- $\beta$ -キシロサイド

【0022】

(3) 至適温度と至適pH

図1に示すようにGlc $\beta$ Npを基質として用いた場合、酵素活性は温度の上昇と共に増加し、100℃でもピークに達しなかった。このことから至適温度は100℃以上であることが明かとなった。また、酵素活性の至適pHは6.0であった(図2)

【0023】

(4) 熱安定性と有機溶媒中での反応性

加熱後の残存活性測定において、本酵素は250 mM NaClを含む50 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)中で、95 °Cで1時間加熱しても80%の活性を保持していた。また、当該酵素は20%のエタノール或いはメタノール存在下pH6.0、60°Cの反応で溶媒非存在下の各々77%、68%の活性を保持しており、40%濃度でも各々13%、18%の活性を保持していた。以上の事実より当該酵素が極めて高い熱安定性と有機溶媒耐性を示すことが明らかになった。

【0024】

【発明の効果】

本発明により、新規な $\beta$ -グリコシダーゼが提供された。この $\beta$ -グリコシダーゼは、極限環境下でも安定であることから、当該酵素を用いた光学純度の高い複合糖質の開発が可能になる。

【0025】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Heat-resistant enzyme having  $\beta$ -glycosidase activity

<130> 11900220

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1269

<212> DNA

<213> Pyrococcus horikoshii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1269)

<400> 1

atg ccg ctg aaa ttc ccg gaa atg ttt ctc ttt ggt acc gca aca tca	48
Met Pro Leu Lys Phe Pro Glu Met Phe Leu Phe Gly Thr Ala Thr Ser	
1 5 10 15	
tcc cat cag ata gag gga aat aat aga tgg aat gat tgg tgg tac tat	96
Ser His Gln Ile Glu Gly Asn Asn Arg Trp Asn Asp Trp Trp Tyr Tyr	
20 25 30	
gag cag att gga aag ctc ccc tac aga tct ggt aag gct tgc aat cac	144
Glu Gln Ile Gly Lys Leu Pro Tyr Arg Ser Gly Lys Ala Cys Asn His	
35 40 45	
tgg gaa ctt tac agg gat gat att cag cta atg acc agc ttg ggc tat	192
Trp Glu Leu Tyr Arg Asp Asp Ile Gln Leu Met Thr Ser Leu Gly Tyr	
50 55 60	
aat gct tat agg ttc tcc ata gag tgg agc agg cta ttc cca gag gaa	240
Asn Ala Tyr Arg Phe Ser Ile Glu Trp Ser Arg Leu Phe Pro Glu Glu	
65 70 75 80	
aat aaa ttt aat gaa gat gct ttc atg aaa tac cgg gag att ata gac	288



Asn Lys Phe Asn Glu Asp Ala Phe Met Lys Tyr Arg Glu Ile Ile Asp	
85	90
95	
ttg tta ttg acg aga ggt ata act ccc ctg gtg acc cta cac cac ttt	336
Leu Leu Leu Thr Arg Gly Ile Thr Pro Leu Val Thr Leu His His Phe	
100	105
110	
act agc cct ctc tgg ttc atg aag aaa ggt ggc ttc ctt agg gag gag	384
Thr Ser Pro Leu Trp Phe Met Lys Lys Gly Gly Phe Leu Arg Glu Glu	
115	120
125	
aac cta aaa cat tgg gaa aag tac ata gaa aag gtt gct gag ctt tta	432
Asn Leu Lys His Trp Glu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ala Glu Leu Leu	
130	135
140	
gaa aaa gtt aaa cta gta gct acc ttc aat gag ccg atg gta tac gta	480
Glu Lys Val Lys Leu Val Ala Thr Phe Asn Glu Pro Met Val Tyr Val	
145	150
155	160
atg atg gga tat cta acg gct tat tgg ccc cca ttc att agg agt cca	528
Met Met Gly Tyr Leu Thr Ala Tyr Trp Pro Pro Phe Ile Arg Ser Pro	
165	170
175	
ttt aag gcc ttt aag gta gct gca aac ctg ctt aaa gct cac gca att	576
Phe Lys Ala Phe Lys Val Ala Ala Asn Leu Leu Lys Ala His Ala Ile	
180	185
190	
gcc tat gaa ctt ctt cat ggg aaa ttc aaa gtt gga atc gta aag aat	624
Ala Tyr Glu Leu Leu His Gly Lys Phe Lys Val Gly Ile Val Lys Asn	
195	200
205	
att ccc ata ata ctc cca gcg agt gac aag gag agg gat aga aaa gcc	672
Ile Pro Ile Ile Leu Pro Ala Ser Asp Lys Glu Arg Asp Arg Lys Ala	
210	215
220	
gct gag aaa gct gat aat tta ttt aac tgg cac ttt ttg gat gcg ata	720
Ala Glu Lys Ala Asp Asn Leu Phe Asn Trp His Phe Leu Asp Ala Ile	
225	230
235	240

tgg agt ggg aaa tac aga ggg gta ttt aaa aca tat agg att ccc caa	768
Trp Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Val Phe Lys Thr Tyr Arg Ile Pro Gln	
245 250 255	
agt gac gca gat ttc att ggg gtt aac tat tac acg gcc agc gaa gta	816
Ser Asp Ala Asp Phe Ile Gly Val Asn Tyr Tyr Thr Ala Ser Glu Val	
260 265 270	
agg cat act tgg aat cct tta aaa ttc ttc ttt gag gtg aaa tta gcg	864
Arg His Thr Trp Asn Pro Leu Lys Phe Phe Phe Glu Val Lys Leu Ala	
275 280 285	
gat att agc gag agg aag act caa atg gga tgg agc gtt tat cca aaa	912
Asp Ile Ser Glu Arg Lys Thr Gln Met Gly Trp Ser Val Tyr Pro Lys	
290 295 300	
gga ata tac atg gcc ctt aaa aaa gct tcc agg tat gga agg cct ctt	960
Gly Ile Tyr Met Ala Leu Lys Lys Ala Ser Arg Tyr Gly Arg Pro Leu	
305 310 315 320	
tat att acg gaa aac gga ata gcg acg ctt gat gat gaa tgg aga gtg	1008
Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Ile Ala Thr Leu Asp Asp Glu Trp Arg Val	
325 330 335	
gaa ttc ata att caa cac ctc caa tac gtt cat aag gct atc gaa gac	1056
Glu Phe Ile Ile Gln His Leu Gln Tyr Val His Lys Ala Ile Glu Asp	
340 345 350	
ggc ctg gat gta aga ggt tac ttc tat tgg tca ttt atg gat aac tac	1104
Gly Leu Asp Val Arg Gly Tyr Phe Tyr Trp Ser Phe Met Asp Asn Tyr	
355 360 365	
gag tgg aaa gag ggg ttt ggg cct aga ttt ggc cta gtg gaa gtt gat	1152
Glu Trp Lys Glu Gly Phe Gly Pro Arg Phe Gly Leu Val Glu Val Asp	
370 375 380	
tat caa acc ttc gag aga agg ccc agg aag agt gct tac gta tac gga	1200
Tyr Gln Thr Phe Glu Arg Arg Pro Arg Lys Ser Ala Tyr Val Tyr Gly	

385	390	395	400	
gaa att gca aga agt aag gaa ata aag gat gag cta tta aag aga tat				1248
Glu Ile Ala Arg Ser Lys Glu Ile Lys Asp Glu Leu Leu Lys Arg Tyr				
	405	410	415	
ggc cta cca gaa ctt caa ctt				1269
Gly Leu Pro Glu Leu Gln Leu				
	420			

<210> 2

<211> 423

<212> PRT

<213> *Pyrococcus horikoshii*

<400> 2

Met	Pro	Leu	Lys	Phe	Pro	Glu	Met	Phe	Leu	Phe	Gly	Thr	Ala	Thr	Ser
1					5						10				15
Ser	His	Gln	Ile	Glu	Gly	Asn	Asn	Arg	Trp	Asn	Asp	Trp	Trp	Tyr	Tyr
				20					25					30	
Glu	Gln	Ile	Gly	Lys	Leu	Pro	Tyr	Arg	Ser	Gly	Lys	Ala	Cys	Asn	His
				35					40					45	
Trp	Glu	Leu	Tyr	Arg	Asp	Asp	Ile	Gln	Leu	Met	Thr	Ser	Leu	Gly	Tyr
		50					55					60			
Asn	Ala	Tyr	Arg	Phe	Ser	Ile	Glu	Trp	Ser	Arg	Leu	Phe	Pro	Glu	Glu
		65				70				75				80	
Asn	Lys	Phe	Asn	Glu	Asp	Ala	Phe	Met	Lys	Tyr	Arg	Glu	Ile	Ile	Asp
				85					90					95	
Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	Gly	Ile	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Leu	His	His	Phe
				100					105					110	
Thr	Ser	Pro	Leu	Trp	Phe	Met	Lys	Lys	Gly	Gly	Phe	Leu	Arg	Glu	Glu

115	120	125
Asn Leu Lys His Trp Glu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ala Glu Leu Leu		
130	135	140
Glu Lys Val Lys Leu Val Ala Thr Phe Asn Glu Pro Met Val Tyr Val		
145	150	155
Met Met Gly Tyr Leu Thr Ala Tyr Trp Pro Pro Phe Ile Arg Ser Pro		160
165	170	175
Phe Lys Ala Phe Lys Val Ala Ala Asn Leu Leu Lys Ala His Ala Ile		
180	185	190
Ala Tyr Glu Leu Leu His Gly Lys Phe Lys Val Gly Ile Val Lys Asn		
195	200	205
Ile Pro Ile Ile Leu Pro Ala Ser Asp Lys Glu Arg Asp Arg Lys Ala		
210	215	220
Ala Glu Lys Ala Asp Asn Leu Phe Asn Trp His Phe Leu Asp Ala Ile		
225	230	235
Trp Ser Gly Lys Tyr Arg Gly Val Phe Lys Thr Tyr Arg Ile Pro Gln		240
245	250	255
Ser Asp Ala Asp Phe Ile Gly Val Asn Tyr Tyr Thr Ala Ser Glu Val		
260	265	270
Arg His Thr Trp Asn Pro Leu Lys Phe Phe Phe Glu Val Lys Leu Ala		
275	280	285
Asp Ile Ser Glu Arg Lys Thr Gln Met Gly Trp Ser Val Tyr Pro Lys		
290	295	300
Gly Ile Tyr Met Ala Leu Lys Lys Ala Ser Arg Tyr Gly Arg Pro Leu		
305	310	315
Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Ile Ala Thr Leu Asp Asp Glu Trp Arg Val		320
325	330	335
Glu Phe Ile Ile Gln His Leu Gln Tyr Val His Lys Ala Ile Glu Asp		
340	345	350

Gly Leu Asp Val Arg Gly Tyr Phe Tyr Trp Ser Phe Met Asp Asn Tyr

355

360

365

Glu Trp Lys Glu Gly Phe Gly Pro Arg Phe Gly Leu Val Glu Val Asp

370

375

380

Tyr Gln Thr Phe Glu Arg Arg Pro Arg Lys Ser Ala Tyr Val Tyr Gly

385

390

395

400

Glu Ile Ala Arg Ser Lys Glu Ile Lys Asp Glu Leu Leu Lys Arg Tyr

405

410

415

Gly Leu Pro Glu Leu Gln Leu

420

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: An upper primer designed to create the NdeI site.

<400> 3

taagaaggag atatacatat gccgctgaaa ttcccggaaa tgtttctctt tgggtacc 57

<210> 4

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A lower primer designed to create the BamHI site.

<400> 4

tttactgcag agaggatccc taatcctaaa gttgaagttc tggtag

46

【図面の簡単な説明】

【図 1】

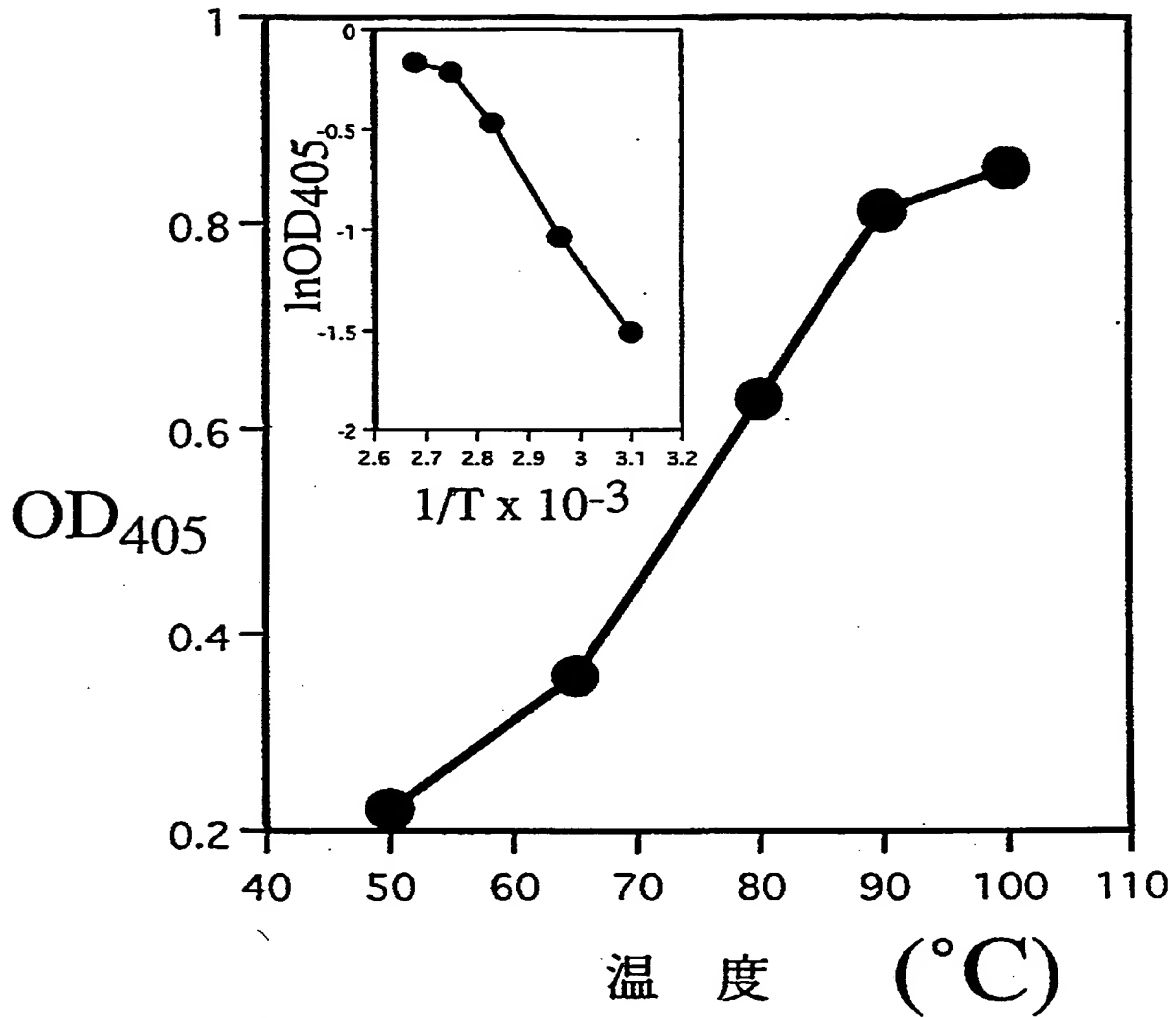
本発明の酵素の活性の温度依存性を示す。インセットの中は触媒活性のアレニウスプロットを示す。

【図 2】

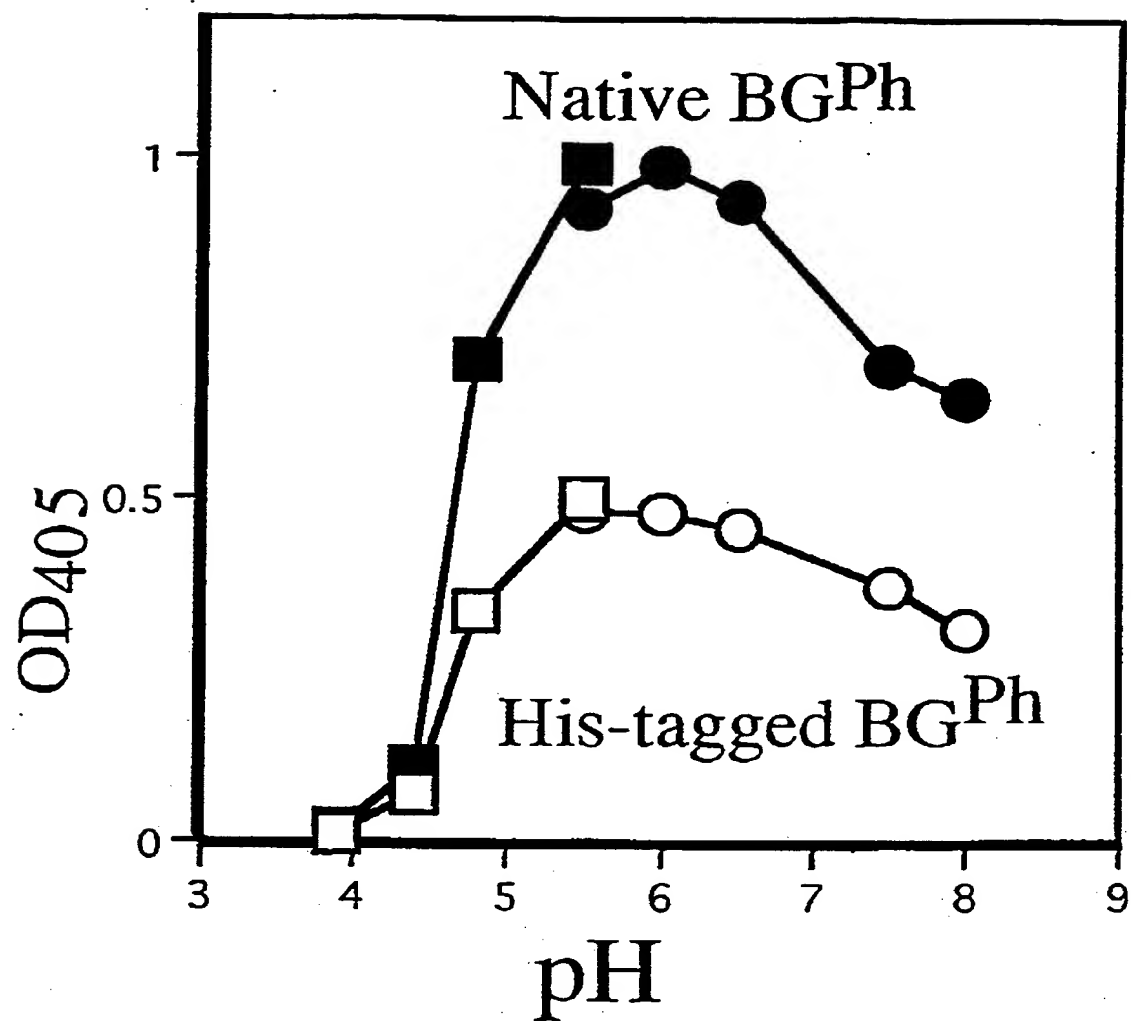
本発明の酵素の活性の至適pHを示す。His-tagged BGPhはベクターpET15bにより発現されたHis-tag融合タンパク質を、Native BGPhはベクターpET11aにより発現されたHis-tagを含まない成熟タンパク質を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】  $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素を提供する。

【解決手段】 配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されてもよいアミノ酸配列からなり、かつ  $\beta$ -グリコシダーゼ活性を有する耐熱性酵素。

【選択図】 なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000001144

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

【氏名又は名称】

工業技術院長

【代理人】

申請人

【識別番号】

220000404

【住所又は居所】

茨城県つくば市東1-1-3

【氏名又は名称】

工業技術院生命工学工業技術研究所長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号  
氏 名 工業技術院長